



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :</b>  <b>A61K 9/50, 49/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/21240</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 29. September 1994 (29.09.94)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE94/00314  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 17. März 1994 (17.03.94)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 43 09 333.7      17. März 1993 (17.03.93)      DE P 44 07 338.0      2. März 1994 (02.03.94)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> SILICA GEL GES.M.B.H [DE/DE]; Ahornallee 36, D-14050 Berlin (DE).  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> PILGRIMM, Herbert [DE/DE]; Sophie-Charlotte-Strasse 27a, D-14169 Berlin (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> WALTER, Wolf-Jürgen usw.; Normannenstrasse 1-2, D-10367 Berlin (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title: SUPERPARAMAGNETIC PARTICLES, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND THEIR USE</b>		
<b>(54) Bezeichnung: SUPERPARAMAGNETISCHE TEILCHEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG DERSELBEN</b>		
<b>(57) Abstract</b>  <p>New superparamagnetic particles useful in medicine for destroying tumors, increasing immunity and diagnosing conditions are disclosed. For that purpose, very small superparamagnetic single-domain particles are aggregated and protected against further aggregation by chemical bonding of reactive stabilizer substances on the surface of the superparamagnetic particles. These new particles thus consist of stable, decomposable aggregates with a particle size in a range between 10 and 1000 nanometres and a defined behaviour in a magnetic field. The aggregates consist of several small superparamagnetic single-domain particles of iron oxide, iron mixed oxide or iron, with a particle size in a range between 3 and 20 nanometres, bearing on their surface chemically bound organic substances from the group comprising the phosphate, diphosphate, polyphosphate, thiophosphate, phosphonate or group containing polyalkylene glycols, phosphate group containing nucleotides, their oligomers or polymers, as well as phosphate group containing carbohydrates, which may present further binding sites. Both the new disclosed superparamagnetic aggregates and reactive stabilizer substances may be active substances.</p>		
<b>(57) Zusammenfassung</b>  <p>Die Erfindung betrifft neue superparamagnetische Teilchen, die in der Medizin zur Tumorschädigung, Immunsteigerung und Diagnostik eingesetzt werden können. Erfindungsgemäß erreicht man dies, indem sehr kleine superparamagnetische Eindomänenteilchen zur Aggregation gebracht werden und durch eine chemische Bindung von reaktiven Stabilisatorsubstanzen auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen vor einer weiteren Aggregation geschützt werden. Die neuen Teilchen bestehen daher aus stabilen, abbaubaren Aggregaten mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer mit definiertem Verhalten im Magnetfeld, wobei die Aggregate aus mehreren kleinen superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxid, Eisenmischoxid oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 20 Nanometer bestehen, die auf ihrer Oberfläche organische Substanzen der Gruppe der phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat- oder thiophosphonatgruppenhaltige Polyalkylenglykole, phosphatgruppenhaltige Nucleotide, deren Oligomere oder deren Polymere sowie phosphatgruppenhaltige Kohlehydrate chemisch gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen haben können. Es können sowohl die neuen superparamagnetischen Aggregate als auch die reaktiven Stabilisatorsubstanzen im erfindungsgemäßen Sinne wirksame Substanzen sein.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Superparamagnetische Teilchen, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung derselben

5

Die Erfindung betrifft superparamagnetische Teilchen, die auf ihrer Oberfläche Substanzen chemisch gebunden haben, die gegebenenfalls weitere Bindungsstellen zur Kopplung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen, diagnostischen oder pharmakologisch wirksamen Substanzen besitzen sowie neue damit in Zusammenhang stehende Verbindungen und die Verwendung dieser Teilchen und Verbindungen in der Medizin zur Tumorschädigung, Immunsteigerung und Diagnostik.

Magnetische Teilchen sind in einer Vielzahl von Veröffentlichungen und Patenten beschrieben worden, vor allen Dingen für die magnetische Separationstechnik und für den Einsatz als Kontrastmittel in der NMR-Diagnostik.

In den 1960'er Jahren versuchte man ferromagnetischen Teilchen als Kontrastmittel für die Röntgendiagnostik und für ein magnetisch kontrolliertes drug targeting einzusetzen. So z.B. MEYERS, P.H. et al. J. Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med., 90,1068,1963; Frei, F.H. et al. J. Appl. Phys., 39,999,1968; Nakamura et al. J. Appl. Phys., 42,1320,1971; Hier erwies sich die irreversible Aggregation der Magnetteilchen unter der Wirkung eines Magnetfeldes als Problem bei der in vivo Anwendung. Ähnliches gilt für die DE-A-3590398, US-A-4,675,173, US-A-4,615,879, WO 84/02643, GB-A-8408127 und WO 84/04330. Hier werden ferromagnetische Teilchen mit Weiß'schen Bezirken in der Größenordnung von einigen Hundert bis einigen Tausend Ångströmeinheiten vorgeschlagen, die mit einer Polymerbeschichtung versehen wurden, um Substanzen mit Bindeaffinität für Gewebe koppeln zu können.

Ferromagnetische Teilchen in der vorgeschlagenen Größe haben so große magnetische Momente, daß die Teilchen sich zu größeren Aggregaten zusammenlagern, auch wenn sie mit einer Polymerbeschichtung versehen werden. Schon während der Beschichtung liegen die Teilchen aggregiert vor. Solche ferromagnetischen Teilchen würden bei parenteraler Anwendung im Körper sedimentieren, die toxischen Nebenwirkungen groß sein.

Ähnliche Nachteile treffen auch für die in der DE-A-3443251 und DE-A-3443252 verwendeten Dispersionen von ferromagnetischen

Teilchen zu, wo die magnetischen Wechselwirkungen zwischen den Teilchen zu Aggregation und Sedimentation führen. Die irreversible Sedimentation der Magnetteilchen erfolgt besonders bei der Einwirkung von Magnetfeldern sehr schnell. Treten Inhomogenitäten des Magnetfeldes auf, konzentrieren sich die Magnetteilchen immer an den Stellen hoher Feldstärken. Diese Nachteile treten besonders bei NMR-Diagnoseverfahren und beim magnetischen drug targeting auf, wobei es zur Ausbildung sehr großer irreversibler Teilchenaggregate kommen kann, die eine große Emboliegefahr bedeuten.

Noch größere ferromagnetische Teilchen sind in US-A-3,933,997, US-A-3,652,761, Nature 270,259,1977, J. Allergy Clin. Immunol. 61,23,1978, US-A-4,177,253, Clin. Chem., 26,730,1980, Clin. Chem., 26,1281,1980, US-A-3,970,518, US-A-4,230,685, US-A-4,267,234, US-A-4,152,210, US-A-4,343,901 beschrieben. Diese Magnetteilchen mit Durchmesser zwischen 10 und 160  $\mu\text{m}$  lassen sich schon mit schwachen Magnetfeldern abscheiden, haben aber den Nachteil, daß sie sehr schnell sedimentieren, eine kleine spezifische Oberfläche für die Bindung von pharmakologisch aktiven Substanzen besitzen, im Magnetfeld irreversibel agglomerieren und für drug targeting wegen der Emboliegefahr zu groß sind.

Die irreversible Agglomeration der Magnetteilchen im Magnetfeld läßt sich verhindern, in dem superparamagnetische Teilchen angewendet werden. Superparamagnetische Teilchen besitzen keine Remanenz, d.h. sie lassen sich in einem magnetischen Gradientenfeld reversibel bewegen und konzentrieren. Solche superparamagnetischen Teilchen sind z.B. Eisenoxide mit einem Teilchendurchmesser kleiner 0,02  $\mu\text{m}$ .

Damit diese superparamagnetischen Teilchen in wäßrigen Dispersionen nicht sedimentieren, werden Stabilisatorsubstanzen zugegeben, die sich adsorptiv auf den Teilchenoberflächen anlagern. Solche Teilchen sind in US-A-3,215,572, US-A-3,531,413, US-A-3,917,538, WO 85/02772, US-A-4,101,435 und US-A-4,452,773, SE--A-8307060-7 beschrieben.

Die adsorptionsstabilisierten Magnetteilchen sind unter physiologischen Bedingungen nicht stabil, da durch Ablösung der Stabilisatorsubstanzen die Magnetteilchen leicht aggregieren. Werden an adsorptionsstabilisierte Magnetteilchen Substanzen mit Bindeaffinität für bestimmte Gewebe oder pharmakologischer Wir-

kung gekoppelt, so besteht die Gefahr, daß die Stabilisatorsubstanzen und somit die Substanzen mit Bindeaffinität und pharmakologischer Wirkung von den Magnetteilchen abgelöst werden und die Magnetteilchen den Bindungsort nicht erreichen oder bei magnetischem drug targeting die pharmakologisch wirksame Substanz am Wirkungsort nicht angereichert wird.

In der EP-A-0284549 enthalten die Stabilisatorsubstanzen Phosphat- oder Phosphonatgruppen, über die sie mit der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen chemisch verbunden sind. Enthalten die Stabilisatorsubstanzen noch chemisch reaktive Gruppen, können pharmakologisch wirksame Substanzen gekoppelt werden. Diese chemisch stabilisierten superparamagnetischen Teilchen sedimentieren nicht in wäßrigen Dispersionen, sie haben nur einen Durchmesser von 0,003 bis 0,01µm. Bei parenteraler Anwendung erfolgt keine Ablösung der Stabilisatorsubstanzen, d.h. es erfolgt keine Aggregation und Sedimentation im Blut und damit eine gute Verteilung im Organismus.

Für ein magnetisches drug targeting sind diese Magnetteilchen zu klein, da sehr große Magnetfeldgradienten eingesetzt werden müßten, um eine Anreicherung der Magnetteilchen in bestimmte Körperregionen zu erreichen.

Größere superparamagnetische Teilchen lassen sich durch Einbetten von kleinen, 0,01µm großen superparamagnetischen Teilchen in poröse Polymerteilchen (SE-A-7706431, Polyglutaraldehyd--Polymere (US-A-4,267,234), Silan-Polymere (US-A-4,554,088), Albumin-Kondensations-Polymere (US-A-4,675,173) oder Celluloseester (Ito,R.,et al., Int.J. Pharm., 61,109,1990), herstellen. Die Teilchendurchmesser liegen im Bereich von 0,05 bis 100µm. Bis auf die Albumin-Kondensations-Polymere und die Celluloseester sind alle verwendeten Polymerisationschemikalien physiologisch bedenkenlich und die Auflösegeschwindigkeit der Magnetteilchen im Körper sehr klein. Alle genannten größeren superparamagnetischen Teilchen sedimentieren im Schwerfeld der Erde, sie müssen deshalb vor der Benutzung wieder dispergiert werden.

Die Eisenoxidgehalte der Polymerteilchen liegen im Bereich von 10 bis maximal 50 Gew.%, der Volumenanteil bei maximal 10 Vol.%.

Je kleiner die Magnetteilchen sind, desto höhere Magnetfeldgradienten benötigt man beim magnetischen drug targeting, um die

Magnetteilchen in bestimmte Körperregionen zu konzentrieren. Je größer die Magnetteilchen sind, desto schneller werden sie vom retikuloendotheliale System gebunden, d.h. die Bioverfügbarkeit verkürzt sich und um so kleiner ist der Anteil an gebundener pharmakologische wirksamer Substanz. Optimale Magnetteilchen für ein magnetisches drug targeting sollten demzufolge möglichst klein sein, eine möglichst große Beladung mit pharmakologisch wirksamen Substanzen, einen möglichst hohen Anteil an Magnetmaterial, eine möglichst große magnetische Permeabilität des Magnetmaterials, eine möglichst große Auflösungsgeschwindigkeit im Körper, und eine ausreichende Bioverträglichkeit im Körper besitzen.

Der in Anspruch 1 angegeben Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen und superparamagnetische Teilchen herzustellen, um die eingangs genannten Nachteile zu vermeiden und neue Anwendungsgebiete insbesondere bei der Tumorbekämpfung und der Immunsteigerung zu erschließen.

Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß sehr kleine superparamagnetische Eindomänenteilchen zur Aggregation gebracht werden und durch eine chemische Bindung von reaktiven Stabilisatorsubstanzen auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen vor einer weiteren Aggregation geschützt werden. Dabei können sowohl die neuen superparamagnetischen Aggregate als auch die reaktiven Stabilisatorsubstanzen im erfindungsgemäßen Sinne wirksame Substanzen sein.

Es ist vorteilhaft die superparamagnetischen Eindomänenteilchen so klein als möglich herzustellen, um die biologische Abbaubarkeit hoch und die Toxizität möglichst gering zu halten. Die superparamagnetischen Eindomänenteilchen liegen dabei im Durchmesserbereich von 0.001 bis 0,02µm, vorzugsweise im Bereich von 0,003 bis 0,01µm.

Als physiologisch verträgliche Materialien für den in vivo Einsatz kommen z.B.  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> und Fe zur Anwendung. Für in vitro Anwendungen sind auch toxischere Magnetmaterialien einsetzbar, wie Eisenmischoxide der allgemeinen Formel MO•Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, worin M die zweiwertigen Metallionen Fe, Mg, Be, Mn, Zn, Co, Ba, Sr, Cu oder Gemische davon bedeuten oder wie Eisenmischoxide der allgemeinen Formel mFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> • nMe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, worin Me die dreiwertigen Metallionen Al, Cr, seltene Erdmetalle oder Gemische davon

bedeuten.

Erfindungsgemäß werden die superparamagnetischen Eindomänen-  
teilchen durch eine thermische Behandlung in wäßriger Dispersion  
unter Änderung des pH-Wertes, der Temperatur und gegebenenfalls  
5 des Druckes, zur Aggregation gebracht. Überraschend wurde gefun-  
den, daß sich die superparamagnetischen Eindomänenteilchen bei  
pH-Änderung der Fällungsdispersion von 8,0 bis 10,0 auf pH 3,0  
bis 7,0 und bei einer Erwärmung auf Temperaturen zwischen 50 und  
120°C zu größeren superparamagnetische Teilchen zusammenlagern.  
10 Überraschend findet kein Kristallwachstum statt, was zu ferroma-  
agnetischen Teilchen führen würde, sondern nur eine Aggregation  
der Eindomänenteilchen zu größeren Teilchenverbänden, so daß der  
superparamagnetische Charakter der Aggregate erhalten bleibt.  
Dabei ist die Stabilität der Aggregate so groß, daß durch die  
15 anschließende Zugabe der Stabilisatorsubstanzen sich nur ein  
geringer Anteil an stabilisierten superparamagnetischen Eindomä-  
nenteilchen bildet. Je nach pH-Wert, Temperatur, Temperaturgra-  
dient, Aggregationszeit, Elektrolytart und Elektrolytkonzentra-  
tion der wäßrigen Dispersion lassen sich unterschiedliche Teil-  
chendurchmesser in engen Durchmesserbereichen herstellen. Je  
20 niedriger der pH-Wert der Dispersion eingestellt wird, desto  
größer werden die Aggregate. In die gleiche Richtung wirken eine  
Temperaturerhöhung und eine Verlängerung der Aggregationszeit.  
Bei zu langen Aggregationszeiten bilden sich vermehrt größere  
25 ferromagnetische Teilchen, die für die erfindungsgemäße Anwendung  
nicht geeignet sind. Auch die Elektrolytart und die Elektrolyt-  
konzentration wirken über die Dicke der elektrochemischen Doppel-  
schicht der superparamagnetischen Eindomänenteilchen auf die  
Teilchenaggregation ein.

30 Die herstellbaren Teilchendurchmesser liegen im Bereich von  
0,01 bis 10  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise jedoch im Bereich von 0,02 bis 1  $\mu\text{m}$ ,  
insbesondere im Bereich von 0,02 bis 0,5  $\mu\text{m}$ . Die kleinen Teilchen  
sind wegen ihrer großen Oberfläche und der damit verbundenen  
größeren Wirkstoffbindung bevorzugt.

35 Erfindungsgemäß erfolgt die Stabilisierung der Magnetteil-  
chen durch eine chemische Bindung von phosphathaltigen Resten,  
ausgewählt unter Monophosphat, Diphosphat, Polyphosphat, Phospho-  
nat, Thiophosphat, Thiophosphonat, oder ein carboxylat-, sulfat-,  
sulfonat-, mercapto-, silantriol-oder trialkoxysilanhaltiger Rest

als Stabilisatorsubstanz auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen. Die Stabilisatorsubstanz muß so beschaffen sein, daß sie mit Wasser mischbar ist und den Magnetteilchenabstand so groß hält, daß die kinetische Energie der Magnetteilchen größer als die magnetische Wechselwirkungsenergie ist. Die Stabilisator-

5 substanz können ausgewählt werden unter den folgenden Substanzen:

(i) den Verbindungen der allgemeinen Formel



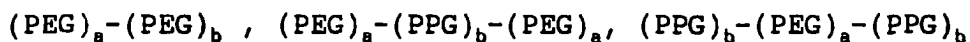
10 worin X eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt aus der Alkoxy-, Alkylamino- und Alkylthiogruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome im Alkylteil dieser Gruppen im Bereich von 1 und 4 liegt, oder eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethyl-

15 lacetal Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat- und Toluolsulfonatgruppe;

R fehlt oder

R ist ein Polyalkylenglykol, ein mit Wasser mischbarer Polypropylenglykolrest oder ein mit Wasser mischbarer Block-Copolymerisatrest aus Polyethylenglykol (PEG) und Polypropylenglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten

20



wobei a eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 100 und b eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 20 darstellt; n ist eine positive ganze Zahl, ausgewählt für PEG im Bereich von 4 bis 300, für PPG im Bereich von 3 bis 12 und für PEG-PPG-Block-copolymerisat im Bereich von 3 bis 140; oder

25

R ist ein Kohlehydratrest, ausgewählt aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Malecitose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktosane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyuridenylsäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure und/oder Alginsäure bestehen;

30

35 A fehlt oder

A ist eine Alkyl-, Alkoxy-, Acyl-, Acylamin-, Alkylamingruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxy-, Acyl-,



Acylamin-, Alkylgruppe im Bereich von 1 bis 4 liegt;

B ist ein phosphorhaltiger Rest, ausgewählt unter Monophosphat, Diphosphat, Polyphosphat, Phosphonat, Thiophosphat, Thiophosphonat, oder ein carboxylat-, sulfat-, sulfonat-, mercapto-,  
5 silantriol-oder trialkoxysilanhaltiger Rest;

(ii) den phosphatgruppenhaltigen Nucleotiden Mono-, Di-, Tri-phosphorsäureester oder Mono-, Di-, Tri-phosphorsäureesterchloriden von Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin, Thymidin, Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin, Desoxythymidin,  
10 Inosin, Pyrimidin, Cytosin, Uracil, Thymin, Purin, Adenin, Guanin, Methylcytosin, 5-Hydroxymethyl-cytosin, 2-Methyladenin, 1-Methylguanin, Thiamin, Flavin, Riboflavin sowie Pyridoxalphosphat, Pyridoxaminphosphat, Ribonucleinsäure, Ribonucleinsäuresequenzen, Desoxyribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuresequenzen;  
15 resequenzen;

(iii) den silicatgruppenhaltigen Verbindungen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukte; und /oder

(iv) X - R - A - B ist Mercaptopurin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymin, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und deren  
20 Mercapto-desoxynucleoside;

(v) X - R - A - B ist ein Polyaminokohlehydrat.

Beispielhafte Stabilisatorssubstanzen sind

(vi) Mono- und Di-[ $\omega$ -Ethylamino-polyethylenglykol]-diphosphat [Molekulargewicht (MG) des PEG ca. 1500], Mono- und  
25 Di-[ $\omega$ -Ethoxy-polyethylenglykol]-thiophosphat (MG des PEG ca.1000) oder Mono- und Di-[ $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol-polypropylenglykol]-phosphat, hergestellt aus Polyglykol M41/40 (Handelsbezeichnung der Fa. Hoechst, Deutschland),

Mono- und Di-[ $\omega$ -Hydroxy-polyethylenglykol]-phosphat (MG PEG ca.1500), Mono- und Di-[ $\omega$ -Oxoethoxy-polyethylenglykol]-phosphonat oder deren Acetale (MG PEG ca.2000), Mono- und Di-[ $\omega$ -Oxoethylamino-polyethylenglykol]-phosphat oder deren Acetale (MG PEG ca. 750), Mono- und Di-[ $\omega$ -Aminoalkoxy-polyethylenglykol]-thiophosphat (MG PEG ca. 1000), Mono- und Di-[ $\omega$ -Hydroxy-polyethylenglykolpolypropylenglykol]-phosphat, hergestellt  
35 aus Synperonic F68 (Handelsbezeichnung von ICI, Großbritannien),

Mono- und Di-[ $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol]-diphosphat (MG PEG ca.1000), das Dimethylacetal von Mono-[ $\omega$ -Oxoethoxy-polyethylenglykol]-diphosphat (MG PEG ca. 2000), Mono-[ $\omega$ -Ethoxy-polyethy-

lenglykol]-polyphosphat (MG PEG ca.2000) oder Mono-[ $\omega$ -Methoxy-polyethylen-glykolpolypropylenglykol-diphosphat, hergestellt aus Polyglykol M 41/40 (Hoechst, DE).

5 Diese reaktiven, polyalkylenglykolhaltigen Stabilisatorsubstanzen können mit ihren Hydroxyl-, Carbonyl- oder Aminogruppen auch zur Einführung anderer reaktiver funktionaler Gruppen, wie z.B. der Thiol-, Epoxy-, Carboxy-, 4,4,6-Dichlortriazin Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonatgruppen, verwendet werden, um andere  
10 Bindungsorte an den gewebespezifischen und pharmakologisch wirksamen Substanzen zu realisieren;

(ii) aus den phosphatgruppenhaltigen Nucleotiden Mono-, Di-, Tri-phosphorsäureestern oder Mono-, Di-, Tri-phosphorsäure-  
15 esterchloriden von Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin, Thymidin, Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin, Desoxythymidin, Inosin, Pyrimidin, Cytosin, Uracil, Thymin, Purin, Adenin, Guanin, Methylcytosin, 5-Hydroxymethyl-cytosin, 2-Methyladenin, 1-Methylguanin, Thiamin, Flavin, Riboflavin sowie Pyridoxalphosphat, Pyridoxaminphosphat, Ribonucleinsäure, Ribonucleinsäuresequenzen, Desoxyribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuresequenzen;  
20 zen;

(iii) aus den phosphat-, diphosphat-, polyphosphat- und thiophosphat-, carboxylat-, sulfat-, sulfonat-, mercapto-, silantriol- oder trialkoxysilangruppenhaltigen Kohlehydraten, wobei  
25 die Kohlehydratreste aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Malecitose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktosane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyridentenylsäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure und/oder Alginsäure bestehen; oder aus mehreren dieser  
30 Reste.

Erfindungsgemäß können an die Stabilisatorsubstanzen, die an  
35 die superparamagnetischen Teilchenoberfläche gebunden sind, gewebespezifische Bindungssubstanzen oder pharmakologisch wirksame Substanzen gekoppelt werden, wenn die Stabilisatorsubstanzen wenigstens zwei chemisch reaktive funktionelle Gruppen tragen, wobei die Phosphat-, Diphosphat-, Polyphosphat-, Thiophosphat-,

Phosphonat-, Thiophosphonat-, Carboxylat-, Sulfat-, Sulfonat-, Mercapto-, Silantriol- oder Trialkoxysilangruppe für die chemische Bindung zu den superparamagnetischen Teilchen dienen und die restlichen reaktiven funktionellen Gruppen, die z.B. aus Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat-, Toluolsulfonatgruppen bestehen, für die Bindung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen und pharmakologisch wirksamen Substanzen dienen.

5 Solche Stabilisatorssubstanzen sind z.B. Mono-, Oligo- oder Polysaccharidphosphate, -carboxylate, -sulfate, -sulfonate, -thiole, -silantrirole oder -trialkoxysilane, die vor oder nach der chemischen Bindung auf der superparamagnetischen Teilchenoberfläche mit den entsprechenden funktionellen Gruppen versehen werden. Unter die genannten Stabilisatorssubstanzen fallen auch die entsprechenden Polysäuren. Die Einführung der funktionellen Gruppen in die Stabilisatormoleküle ist bekannter Stand der Technik.

20 Außer diesen reaktiven Stabilisatorssubstanzen auf Kohlehydratbasis können reaktive phosphatgruppenhaltige Biomoleküle, wie z.B. Pyridoxalphosphat, Pyridoxaminphosphat oder Co-carboxylase; mercaptogruppenhaltige Substanzen wie Mercaptopurin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymine, -hypoxanthin, sowie deren Mercaptoside und deren Mercapto-desoxynucleoside;

25 silantriol- oder trialkoxysilangruppenhaltige Substanzen wie  $\omega$ -Ethylamino-polyethylenglykol-trimethoxysilan (MG des PEG ca. 1000),  $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol-trimethoxysilan (MG des PEG ca. 750) oder  $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol-polypropylenglykol-thioethyl-triethoxysilan, hergestellt aus Polyglykol M41/40 (Hoechst),  $\omega$ -Hydroxy-polyethylenglykol-silantriol, 3-Chlorpropyl-tri-methoxysilan, 2-Mercaptopropyl-triethoxysilan, 3-Aminopropyl-triethoxysilan, 3-(2-Aminoethylamino)propyl-trimethoxysilan, Vinyl-triethoxysilan, Vinyl-tri(methoxyethoxy)silan, Methacryloxypropyl-trimethoxysilan, oder Poly-trialkoxysilyl-Stärke, Poly-trialkoxysilyl-Dextran, Poly-trialkoxysilyl-Dextrin; 30 sulfatgruppenhaltige Substanzen, wie Dextransulfat, Dextrinsulfat, Inulinsulfat; carboxylatgruppenhaltige Substanzen, wie Polycarboxydextran, Polycarboxydextrin, Polycarboxyamylopektin;

polyaminogruppenhaltige Substanzen, wie Polyaminodextran;  
silicatgruppenhaltigen Verbindungen der Orthokieselsäure und  
deren Kondensationsprodukte, wobei hier zur Stabilisierung der  
superparamagnetischen Teilchen Natrium- oder Kaliumsilikatlösung  
5 oder alkalische Lösungen von Alkalisilikaten mit kondensations-  
fähigen Hydroxoaluminaten;  
sowie deren Polyverbindungen verwendet werden.

Erfindungsgemäß können an die Stabilisatormoleküle, die mit  
ihren Monophosphat-, Diphosphat-, Polyphosphat-, Phosphonat-,  
10 Thiophosphat-, Thiophosphonat-, Carboxylat-, Sulfat-, Sulfonat-,  
Mercapto-, Silantriol- oder Trialkoxysilangruppen mit der super-  
paramagnetischen Teilchenoberfläche chemisch gebunden sind, gewe-  
bespezifischen Bindungssubstanzen, wie z.B. Antigene, Antikörper,  
Haptene, Protein A, Protein G, Endotoxin-bindende Proteine,  
15 Lectine, Selectine, gekoppelt werden.

Auch pharmakologisch wirksame Substanzen, wie z.B. Antitu-  
morproteine, Enzyme, Antitumorenzyme, Antibiotika, Pflanzenalka-  
loide, Alkylierungsreagenzien, Antimetaboliten, Hormone und  
Hormonantagonisten, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren,  
20 Tumornekrosefaktoren, Endotoxine, Lymphotoxine, Urokinase,  
Streptokinase, Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex, Ge-  
webe-Plasminogen-Aktivatoren, Desmodus-Plasminogen-Aktivatoren,  
Makrophagen-Aktivierungskörper, Antisera, Proteaseninhibitoren,  
radioaktiven Phosphor  $^{32}\text{P}$  enthaltene Stabilisatorsubstanzen, Ten-  
25 side oder pharmakologisch wirksame Zellen, wie z.B. Organellen,  
Viren, Mikroben, Algen, Pilze, insbesondere Erythrozyten, Thro-  
mbozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Langerhans'sche  
Inseln oder pharmakologisch wirksame Komplexbildner aus der  
Gruppe der Polycarbonsäuren, Aminocarboxylsäuren, Porphyrinen,  
30 Katecholamine oder zellfusionsvermittelnde Substanzen  
können an die reaktiven Stabilisatorsubstanzen einzeln oder  
nebeneinander gekoppelt werden.

Als zellfusionsvermittelnde Substanzen bewirken beispiels-  
weise Polyethylenglykole in Konzentrationen über 25 Gew.-%, wie  
35 sie in noch höheren Konzentrationen in den Stabilisatorsubstanz-  
schichten der superparamagnetischen Teilchen auftreten, Zell-  
fusionen, was bei einer Anreicherung der polyethylenglykolhalti-  
gen superparamagnetischen Teilchen in Tumoren zu einer weiteren  
Schädigung des Tumorgewebes führen kann.

Erfindungsgemäß können außer den Stabilisatorsubstanzen auch noch phosphat- oder phosphonatgruppenhaltige Arzneimittel chemisch auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen gebunden werden, wie z.B. Estramustin oder Diethylstilbestrol-diphosphat.

5 Die Toxizität solcher pharmakologisch wirksamen Substanzen kann dabei relativ hoch sein, da die Magnetteilchen sich aufgrund ihrer gewebespezifischen Wechselwirkung bevorzugt an den entsprechenden Bindungsstellen anreichert oder durch magnetisches drug targeting zum Wirkungsort transportiert und angereichert werden.  
10 Die Dosis der pharmakologisch wirksamen Substanzen kann gering gehalten werden, da sich die Substanz am Wirkungsort konzentriert und der übrige Körper nur gering belastet wird.

Die Kopplung pharmakologisch wirksamer Substanzen an die superparamagnetischen Teilchen hat weiterhin den Vorteil, daß  
15 über die Relaxationszeitverkürzung der Therapiefortschritt mit der Kernspin-Diagnostik beobachtet werden kann.

Die Herstellung der superparamagnetischen Teilchen erfolgt durch eine gezielte Agglomeration von superparamagnetischen Eindomänenteilchen. Dabei werden die superparamagnetischen Ein-  
20 domänenteilchen in Wasser verrührt und bei einem pH-Wert von 3 bis 7 durch Erhitzen auf 50 bis 120°C, bei Temperaturen über 100°C im Autoklaven, zur Aggregation gebracht. Nach dem Abkühlen der Dispersion werden die Teilchen so lange gewaschen, bis die elektrische Leitfähigkeit des Filtrates  $< 10 \mu\text{S/cm}$  beträgt. Die  
25 so hergestellten superparamagnetischen Teilchen bilden sofort einen schnell sedimentierenden Niederschlag, der sich auch durch starkes Rühren oder durch Ultraschallbehandlung nicht in eine stabile Dispersion überführen läßt. Erst die chemische Bindung von phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphon-  
30 onat, carboxylat-, sulfat-, sulfonat-, thiol-, silantriol- oder trialkoxysilangruppenhaltigen Stabilisatorsubstanzen auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen sorgt für eine schnelle Dispergierung, bei einigen Stabilisatorsubstanzen sogar schon bei leichtem Rühren mit dem Glasstab.

35 Je nach Anwendungsgebiet können die magnetischen Dispersio-  
nen dialysiert werden, um den überschüssigen Anteil an Stabilisatorsubstanz zu entfernen. Vor allen Dingen bei chemisch reaktiven superparamagnetischen Teilchen, die zur Kopplung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen und pharmakologisch wirksamen

Substanzen verwendet werden sollen ist eine Dialyse notwendig.

Die stabilisierten superparamagnetischen Teilchendispersio-  
nen enthalten die noch nicht oder nur schwach aggregierten super-  
paramagnetischen Eindomänenteilchen. Diese bilden eine stabile  
5 magnetische Flüssigkeit, die sich leicht von den größeren super-  
paramagnetischen Teilchen durch eine Sedimentation in einem  
Magnetfeld entsprechender Stärke und Inhomogenität abtrennen  
lassen.

In einer einfachen Ausführung der magnetischen Separation  
10 stellt man ein Becherglas mit der magnetischen Dispersion auf  
einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1  
mT und gießt nach einer Sedimentationszeit von ca. 30 min die  
überstehende magnetische Flüssigkeit ab. Zurück bleiben die  
superparamagnetischen Teilchen, die, je nach Teilchengröße, sich  
15 wieder spontan in der Dispersion verteilen oder als Bodensatz im  
Becherglas zurück bleiben. Bis zu Teilchengrößen von ungefähr 500  
nm verteilen sich die superparamagnetischen Teilchen wieder  
spontan oder unter leichtem Rühren im wäßrigen Dispersionsmittel.  
Größere superparamagnetische Teilchen als ca. 500 nm können  
20 leicht durch stärkeres Rühren oder Ultraschallbehandlung disper-  
giert werden.

Die Sedimentationsstabilität der erfindungsgemäßen superpa-  
ramagnetischen Teilchen ist wesentlich höher als bei den bisher  
bekannten Magnetteilchen mit vergleichbaren magnetischen Eigen-  
25 schaften, was wahrscheinlich auf die starke Strukturierung der  
die superparamagnetischen Teilchen umgebenden Wassermoleküle und  
den damit vergrößerten Stokes'schen Teilchendurchmesser zurück-  
zuführen ist.

Die magnetischen Eigenschaften der superparamagnetischen  
30 Teilchen sind aufgrund des geringen Anteils an Stabilisatorsub-  
stanz stärker als bei den bisher bekannten. Da der Anteil an  
superparamagnetischen Eindomänenteilchen wesentlich höher als bei  
den bisher bekannten Magnetteilchen ist, ist auch die Abschei-  
dungsgeschwindigkeit der superparamagnetischen Teilchen in einem  
35 inhomogenen Magnetfeld größer. In einer 10 Gew.-%igen wäßrigen  
Dispersion von superparamagnetischen Teilchen mit einem Durch-  
messer von ca 100 nm und einem Magnetitanteil von 95 % beträgt  
die Abscheidungszeit der Magnetteilchen auf einen Permanentma-  
gneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 mT weniger als

1 min.

Die erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen haben Eisenoxidgehalte von 90 bis 98 Gew.-%. Gegenüber dem Stand der Technik, daß Magnetteilchen bis zu 50 Gew.-% Eisenoxid enthalten können, bedeutet das eine wesentliche Verbesserung der magnetischen Eigenschaften. Damit können die neuen superparamagnetischen Teilchen, bei gleichen magnetischer Wechselwirkung, entsprechend kleiner als die bisher bekannten Magnetteilchen sein. Die spezifische Oberfläche vergrößert sich, es können mehr pharmakologisch wirksame Substanzen oder gewebespezifische Bindungssubstanzen auf der Oberfläche gekoppelt werden. Mit Verkleinerung der Teilchengröße wird auch die biologische Verträglichkeit besser, die Abbaugeschwindigkeit im Körper erhöht. Auch die freie verfügbare Zeit der Magnetteilchen beim magnetischen drug targeting, d.h. die Zeit bis die Teilchen vom retikuloendothelialen System gebunden sind, erhöht sich mit Verringerung der Teilchengröße.

Die Bioverfügbarkeit der superparamagnetischen Teilchen im Körper beträgt nur wenige Minuten, d.h. das retikuloendotheliale System bindet die superparamagnetischen Teilchen sehr schnell. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten erhalten magnetisierbare Eigenschaften, wenn sie sich an die superparamagnetischen Teilchen anheften. Voraussetzung für dieses Anheften ist, daß die Stabilisatorssubstanzen der superparamagnetischen Teilchen an die Rezeptoren der Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten gebunden werden. Erfolgt solch eine Bindung, können die magnetisierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mit Hilfe von Magnetfeldern bewegt werden. Die Makrophagen und die neutrophilen Granulozyten können die endotheliale Barriere in den Hochendothel-Venolen durchdringen und in das Gewebe eindringen. Dieser Prozeß kann bei magnetisierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten durch die Einwirkung eines Magnetfeldes unterstützt werden. Bei einem magnetischen drug targeting von Tumoren mit den erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen kann somit eine beschleunigte Anreicherung der magnetisierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Tumorgewebe erfolgen und eine immunologische Schädigung des Tumorgewebes einsetzen.

An der Phasengrenze zwischen den superparamagnetischen Teilchen und diamagnetischen Zellen treten mechanische Kräfte auf, die proportional der Permeabilitätsdifferenz der sich berüh-

renden Materialien und dem Quadrat der wirkenden Magnetfeldstärke sind.

Da die erfindungsgemäßen Teilchen einen sehr hohen Anteil an superparamagnetischen Teilchen besitzen und die Stabilisator-  
5 substanz nur eine monomolekulare Schicht von wenigen Nanometern Dicke besitzt, treten an den Phasengrenzen zu diamagnetischen Zellen Kräfte auf, die zur Schädigung der Zellen führen können. Diese Kräfte können z.B. bei der Anreicherung der superparamagnetischen Teilchen in Tumoren, zu einer Tumorschädigung führen.  
10 Dieser magnetomechanische Effekt könnte auch dazu führen, daß bei einer starken Wechselwirkung zwischen der Stabilisatorsubstanz der superparamagnetischen Teilchen und dem Tumorgewebe, Oberflächenmoleküle des Tumorgewebes von den superparamagnetischen Teilchen gebunden und herausgezogen werden. Wenn diese superpara-  
15 magnetischen Teilchen von den Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden, können die Oberflächenmoleküle des Tumors als Antigen erkannt werden, auch wenn sie sonst nicht vom Immunsystem als Antigen identifiziert worden wären. Es kann eine mehr oder weniger starke Immunantwort des Körpers auf die  
20 Oberflächenmoleküle des Tumors und damit eine Schädigung des Tumors auftreten.

Eine Stimulierung des Immunsystems durch magnetomechanische Effekte kann auch dadurch erreicht werden, daß Viren, Bakterien oder Pilze in vitro mit reaktiven superparamagnetischen Teilchen  
25 gemischt werden. So können superparamagnetische Teilchen, die z.B. mit Mono-[ $\omega$ -Oxoethoxy-polyethylen-glykol]-phosphat stabilisiert wurden, mit den Aminogruppen der Oberflächenproteine der Viren oder Bakterien kovalente chemische Bindungen eingehen. Durch Einwirkung starker inhomogener Magnetfelder oder mit Hilfe  
30 bekannter Zellaufschlußmethoden lassen sich so Oberflächenmoleküle der Viren-, Bakterien- oder Pilzoberflächen mit den superparamagnetischen Teilchen herstellen. Diese superparamagnetischen Proteinbruchstücke werden beim Spritzen in den Körper vom retikulendothelialen System aufgenommen, die Proteinbruchstücke als  
35 Antigen erkannt und der Körper reagiert mit einer entsprechenden Immunantwort, unter anderem mit einer Produktion von entsprechenden Antikörpern. So läßt sich auch eine Immunantwort des Körpers von Proteinen stimulieren, die für sich alleine vom Körper nicht als Antigen erkannt werden. Das hat besondere Bedeutung bei der



Erzeugung einer Immunabwehr des Körpers gegen Tumorzellen, Viren, Bakterien, Hefen oder Pilze, für die es noch keine geeignete Chemotherapie gibt oder bei denen sich eine Resistenz gegen bekannte angewendete Arzneimittel herausgebildet hat.

5 Durch die Kopplung von reaktiven superparamagnetischen Teilchen an die Oberflächenmoleküle von z.B. Tumorzellen, Viren, Bakterien, Hefen, Pilzen und Heraustrennen dieser Oberflächenmoleküle durch starke inhomogene Magnetfelder oder bekannte Zellaufschlußverfahren lassen sich immunstimulierende superparamagnetische Molekülkomplexe gewinnen, die bei in vivo Anwendung  
10 zur Immunstimulierung und Schädigung dieser biologischen aktiven Zellen führen können.

Die diphosphat- oder polyphosphathaltigen Stabilisatorsubstanzen auf der Basis von Polyalkylenglykolen sind neue Verbindungen und besitzen selbst eine tumorschädigende Wirkung.  
15

So werden bei der in vivo Anwendung dieser Stabilisatorsubstanzen Tumore von Mäusen geschädigt. Durch eine Kopplung dieser Stabilisatorsubstanzen an die superparamagnetischen Teilchen läßt sich die tumorschädigende Wirkung verstärken, indem durch ein  
20 magnetisches drug targeting die Konzentration der Stabilisatorsubstanz im Tumor wesentlich erhöht. Neben einer Verstärkung der tumorschädigenden Wirkung durch das magnetische drug targeting ist auch eine erhebliche Verkürzung der Wirkungszeit, bis zur beginnenden sichtbaren Tumorschädigung zu beobachten.

25 Die Stabilisatorsubstanzen sind nach dem Stand der Technik leicht herzustellen.

Die Herstellung der Polyethylenglykole erfolgt durch Oxethylierung einer reaktiven organischen Ausgangsverbindung, wie z.B. 2-Methoxyethanol, Aminoacetaldehyd-dimethylacetal, 2-Methoxy--  
30 ethylamin, 2-Aminoethanol mit Ethylenoxid.

Siehe H o u b e n - W e y l, Bd. XIV/2, S.425 ff. (1963)

Die Einführung der Phosphat-, Diphosphat-, Polyphosphat- oder Thiophosphatgruppe in die Polyethylenglykole erfolgt leicht durch Reaktion mit verschiedenartigen Phosphorylierungsreagenzien bei  
35 Raum- oder erhöhten Temperaturen.

Siehe H o u b e n - W e y l, Bd. XII/2, S.131 ff. (1964), Bd. E2, XII/2, S.300 ff. (1982)

Analog erfolgt die Herstellung von phosphatgruppenhaltigen Kohlehydraten, auch von phosphatgruppenhaltigen Polysaccharid--

carbonsäuren (siehe US-A-2970141).

Bei der Herstellung von  $\omega$ -Oxoalkoxy-polyethylenglykol-phosphaten geht man zweckmäßig von den Dimethylacetalen entsprechender Alkohole aus, um die Oxogruppe bei der Ethoxylierung und bei der Einführung der Phosphat- oder Phosphonatgruppe zu schützen.  
5 Die Acetale können durch saure Hydrolyse mit Säuren oder durch schonende Spaltung mit Ionenaustauschern freigesetzt werden.  
Siehe H o u b e n - W e y l, Bd.VI/3, S.203-293 (1964)

Die Herstellung der phosphonatgruppenhaltigen Polyethylenglykole kann nach vielfältigen Methoden erreicht werden.

10 Siehe G. M. K o s o l a p o f f, L. M a i e r, Organic Phosphorous Compounds. Wiley Inters., New York, 1972-1976, Vol.7, S.1-486 (1976),

H o u b e n - W e y l, Bd. XII/1, S.338-619 (1963),

15 H o u b e n - W e y l, Bd. E2, S.300-486 (1982),

und insbesondere DE-A-3407565, DE-A-2424453 und DE-A-3203309.

Die Herstellung der silikatgruppenhaltigen organischen Substanzen erfolgt z.B. durch Reaktion von lithium- oder natriumorganischen Verbindungen der allgemeinen Formel

20 X - R - Li bzw. X - R - Na mit Tetraalkoxysilanen oder Trialkoxychlorosilanen (siehe H o u b e n - W e y l, Bd. XIII/5, S.180 ff. (1980)). Eine weitere einfache Möglichkeit zur Herstellung silikatgruppenhaltiger organischer Verbindungen ist die Umsetzung der X - R - (p-Toluolsulfonate) mit z.B. 2-Mercaptopropyl-triethoxysilan, 3-Aminopropyl-triethoxysilan im alkalischen Medium  
25 (siehe K.Nilsson, K.Mosbach;Eur.J.Biochem. 112, 397-409,1980).

Die Herstellung der mercaptogruppenhaltigen organischen Substanzen erfolgt z.B. aus den X - R - Halogen-Verbindungen durch Umsetzung mit Thioharnstoff und nachfolgender alkalischer Hydrolyse zu den entsprechenden Mercaptoverbindungen (siehe  
30 Houben-Weyl, Bd.IX, S.3 ff. (1955),Bd.E2, XI E, S.32 ff.(1985)).

Die Herstellung der polycarbonsäuregruppenhaltigen Kohlehydrate erfolgt durch Oxidation der Kohlehydrate z.B. mit Kaliumpermanganat, Eisen(II)-salzen/Wasserstoffperoxid, Perjodsäure  
35 (siehe A.H.Haines, Hrsg., Methods for the Oxidation of Organic Compounds, Academic Press, London, 1988).

Die Herstellung der silikatgruppenhaltigen anorganischen Kondensationsprodukte erfolgt durch einfaches Mischen von Natriumsilikatlösung mit z.B. Natriumaluminat.

Die Herstellung der polysulfatgruppenhaltigen Kohlehydrate erfolgt z.B. durch Chlorsulfonierung von Kohlehydraten.

Das Hauptanwendungsgebiet der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen liegt auf dem Gebiet des magnetischen drug targeting. Aufgrund der sehr hohen Anteiles an Magnetmaterial (90 bis 98 Gew.-%) lassen sich schon kleine Magnetteilchen sehr gut und sehr schnell in bestimmte Regionen des Körpers mit Hilfe von elektromagnetischen oder Permanentmagnet-Feldern konzentrieren. Bei Kopplung von pharmakologisch wirksamen Substanzen an die superparamagnetischen Teilchen, kann deren Konzentration am Wirkungsort drastisch erhöht werden. Dieser Umstand hat für die Krebstherapie besondere Bedeutung, da die zur Chemotherapie von Tumoren eingesetzten Substanzen sehr starke Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus ausüben und bei einer Anreicherung am Wirkungsort der übrige Körper weniger stark mit Zytostatika belastet wird.

Die superparamagnetischen Teilchen können durch Kopplung an Viren, Zellen und deren Oberflächenmolekülen zur Immunaktivierung im Körper eingesetzt werden, wobei die Einwirkung von Magnetfeldern die Immunaktivierung unterstützt.

Die reaktiven superparamagnetischen Teilchen können auch zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden, wenn auf der Oberfläche der Teilchen die entsprechenden diagnostischen Substanzen chemisch gebunden werden. Aufgrund der starken magnetischen Wechselwirkung mit Magnetfeldern, lassen sich auch sehr kleine superparamagnetische Teilchen nach erfolgter diagnostischer Reaktion leicht aus dem Reaktionsgemisch wieder abtrennen.

Die superparamagnetischen Teilchen können auch als Kontrastmittel für Kernspin-Diagnostik eingesetzt werden.

Die Konzentration der einzusetzenden superparamagnetischen Teilchen ist beim magnetischen drug targeting abhängig von der Teilchengröße, von der Zusammensetzung der Stabilisatorsubstanzen, von der magnetischen Feldstärke am Wirkungsort und wie groß die Entfernung von der Injektionsstelle zum Wirkungsort ist. Um eine Nekrose eines Tumores bei Nacktmäusen zu erreichen, ist eine Menge an Injektionsflüssigkeit von ca. 0,01 bis 0,2 Vol-% des Blutvolumens notwendig, wobei die magnetischen Sättigungsinduktion bei ca. 5 mT liegt.

Die Mengen an superparamagnetischen Teilchen liegen bei der

Anwendung als Kontrastmittel für die MRI bei ca. 0,001 Vol-% des Blutvolumens, wenn die magnetische Sättigungsinduktion bei ca. 5 mT liegt.

5 An Beispielen sollen die Herstellung der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen erläutert werden.

Beispiel 1

Eisen(III)-chlorid (270 g) und Eisen(II)-chlorid(119 g) werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Ammoniakwasser wird unter Rühren der pH-Wert der Lösung auf 9,6 eingestellt. Nach 10 erfolgter Fällung wird die Dispersion mit Salzsäure auf den pH 6,0 eingestellt und die Dispersion auf 100°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag mit dest. Wasser gewaschen, bis die elektrische Leitfähigkeit < 10 µS/cm beträgt.

Die gebildeten superparamagnetischen Teilchen bestehen aus Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. 15 Sie können stabilisiert werden.

Beispiel 2

Eisen(III)-chlorid (270 g) und Eisen(II)-sulfat (153 g) werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Ammoniakwasser wird unter Rühren der pH-Wert der Lösung auf 9,0 eingestellt. Nach erfolgter Fällung wird die Dispersion unter Rühren 20 mit Salzsäure auf pH 5,0 eingestellt und mit 30%-iger Wasserstoffperoxidlösung (22 ml) versetzt und 30 min auf 80°C erwärmt. Nach dem Abkühlen der Dispersion wird der Niederschlag gewaschen bis die elektrische Leitfähigkeit < 10 µS/cm beträgt. Die ent- 25 standenen superparamagnetischen Teilchen aus γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und können stabilisiert werden.

Beispiel 3

Eisen (III)-chlorid (270 g) und Zinkchlorid (82 g) werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Natronlauge wird unter 30 Rühren ein pH-Wert von 8,5 eingestellt. Nach erfolgter Fällung wird die Dispersion unter Rühren mit Salzsäure auf den pH-Wert von 4,0 eingestellt und auf 110°C im Autoklaven erwärmt. Nach dem Abkühlen der Dispersion wird der Niederschlag gewaschen, bis das Filtrat eine elektrische Leitfähigkeit von < 10 µS/cm besitzt. 35 Das entstehende Zink-Ferrit kann stabilisiert werden.

Die Stabilisierung der superparamagnetischen Teilchen erfolgt durch Mischen einer wäßrigen oder niedrigsiedende polare Lösungsmittel enthaltenden Stabilisatorlösung mit den Magnet- teilchen bei Raumtemperatur. Die Stabilisatorlösung kann dabei,

je nach den gewünschten Eigenschaften, aus reinen Stabilisatorsubstanzen oder aus Mischungen von Stabilisatorsubstanzen bestehen. Zur Beschleunigung der Dispergierung und Stabilisierung kann die Dispersion gerührt oder mit Ultraschall behandelt werden.  
5        Kommen niedrigsiedende organische Lösungsmittel zur Anwendung, werden diese zur Entfernung nach der Stabilisierung durch Vakuumverdampfung oder Dialyse entfernt.

An einigen Beispielen soll die Stabilisierung der superparamagnetischen Teilchen nachfolgend erläutert werden.

10        Beispiel 4

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 50 g Mono[ $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol]-phosphat (Molekulargewicht ca.1000) in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min gerührt. Die entstehende Dispersion wird 30 min auf  
15        einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 T sedimentiert und der Überstand von magnetischer Flüssigkeit abgesaugt. Das Sediment auf dem Magnetfeld enthält die superparamagnetischen Teilchen. Durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser und erneuter Sedimentation im Magnetfeld können die superparamagnetischen Teilchen rein und in enger Teilchengrößenverteilung erhalten werden. Die superparamagnetischen Teilchen haben  
20        einen mittleren Teilchendurchmesser von 120 nm.

Diese superparamagnetischen Teilchen sind sehr gut für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet. Hier können sie  
25        durch magnetomechanische Immunstimulierung, oder zusätzlich durch Hyperthermie, d.h. durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung und Erwärmung des Tumors, den Tumor zerstören. Die superparamagnetischen Teilchen sind auch als orales oder i.v. Kontrastmittel für die MRI anwendbar.

30        Beispiel 5

Die gesamte Menge des Zink-Ferrit-Niederschlages von Beispiel 3 wird in eine Lösung von 50 g Di[ $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol]-phosphat (Molekulargewicht ca. 1500) in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert.  
• 35        Die entstehenden superparamagnetischen Teilchen haben einen Durchmesser von 310 nm. Die Dispersion wird gegen dest. Wasser dialysiert und durch ein 0,45- $\mu$ m-Filter filtriert. Das entstehende Produkt ist als orales Kontrastmittel für das MRI anwendbar.

Beispiel 6

- Die gesamte Menge an  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Teilchen von Beispiel 2 wird in eine Lösung von 20 g Mono-[ $\omega$ -Oxoethoxy-polyethylenglykol]-phosphat (Molekulargewicht ca. 1800), 15 g Mono- und 15 g
- 5 Di-[ $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol]-phosphat (Molekulargewicht ca. 1000) in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min mit einem Ultraschalldispersator (100 W Leistung) dispergiert. Die entstehende Dispersion wird mit einem 50 kD-Filter gegen dest. Wasser dialysiert, um überschüssige Stabilisatorsubstanzen zu entfernen.
- 10 Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 4 beschrieben. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 180 nm.
- 15 Die nach Beispiel 6 hergestellten superparamagnetischen Teilchen sind für viele Kopplungsreaktionen verwendbar, bei denen die Reaktivität der Aldehydgruppe Anwendung finden kann. So z.B. für die Kopplung von aminogruppenhaltigen pharmakologisch wirksamen Substanzen, wie Streptokinase oder Plasminogen-Streptokinase-
- 20 Aktivator-Komplex.

Beispiel 7

- 10 ml der Dispersion von Beispiel 6, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 5 mT, werden mit 30 mg Anistreplase gemischt und 20 min bei Raumtemperatur stengelassen. Das ent-
- 25 stehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting zur Auflösung von Blutgerinnseln einsetzbar.

- Die nach Beispiel 6 hergestellten reaktiven superparamagnetischen Teilchen sind auch für die Herstellung von Substanzen für das magnetische drug targeting in der Tumorthherapie geeignet, wie
- 30 an Beispiel 8 erläutert werden soll.

Beispiel 8

- 10 ml der Dispersion von Beispiel 6, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 5 mT, werden mit 10 ml einer 10-gew.-%igen MITOMYCIN C Lösung gemischt und 30 min bei Raumtemperatur
- 35 geschüttelt. Das entstehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting gegen Leukämie anwendbar.

Beispiel 9

- 10 ml der Dispersion von Beispiel 6, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 5 mT, werden mit 10 mg EPIRUBICIN-Hydro-

chlorid gemischt und 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das entstehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting in der Tumorthherapie anwendbar.

Erfindungsgemäß können auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen auch direkt phosphat- oder phosphonatgruppenhaltige Arzneimittel chemisch gebunden werden, indem die 0,2-bis 0,3-fache Menge der zuzusetzenden Stabilisatormenge in Form des Arzneimittels zum unstabilisierten Niederschlag zugegeben wird und nach 5 min Rühren die entsprechende restliche Menge des Stabilisators, unter weiterem Rühren, zugesetzt wird.

#### Beispiel 10

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird mit einer Lösung von 10 g ESTRAMUSTIN in 250 ml dest. Wasser gemischt und 5 min gerührt. Anschließend wird 40 g Di-( $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol)-phosphat (Molekulargewicht ca. 750) in 250 ml dest. Wasser gelöst, zur Mischung gegeben und 5 min gerührt. Die entstandene Dispersion wird 30 min auf einem Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 mT sedimentiert und der Überstand von magnetischer Flüssigkeit abgesaugt. Das Sediment auf dem Magneten enthält die superparamagnetischen Teilchen und wird durch ein 0,45- $\mu$ m-Filter filtriert. Das entstehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting des Prostatakarzinoms anwendbar.

#### Beispiel 11

Die gesamte Menge des Magnetitniederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung eines Gemisches von 40 g Mono-( $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol)-phosphat, -diphosphat und -polyphosphat, mit dem Mischungsverhältnis von ungefähr 8:1:1 und einem mittleren Molekulargewicht von ca. 750, in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min gerührt. Die entstehende Dispersion wird 30 min auf einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 T sedimentiert und der Überstand von magnetischer Flüssigkeit abgesaugt. Das Sediment auf dem Magnetfeld enthält die superparamagnetischen Teilchen. Durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser und erneuter Sedimentation im Magnetfeld können die superparamagnetischen Teilchen rein und in enger Teilchengrößenverteilung erhalten werden. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 120 nm.

Diese superparamagnetischen Teilchen sind sehr gut für die

magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet. Hier können sie durch magnetomechanische Immunstimulierung, oder zusätzlich durch Hyperthermie, d.h. durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung und Erwärmung des Tumors, den Tumor zerstören. Die superparamagnetischen Teilchen sind auch als orales oder i.v. Kontrastmittel für die MRI anwendbar.

Durch Anwendung von Stabilisatorgemischen können die superparamagnetischen Teilchen bei bestimmten, ausgewählten pH-Werten zur Aggregation gebracht werden. So kann die Ausfällung der superparamagnetischen Teilchen in alkalischen Tumoren, zusätzlich zur Anreicherung durch magnetisches drug targeting, zu einer magnetomechanischen Schädigung der Tumoren führen, wenn zum Beispiel ein Gemisch aus Cocarboxylase, Mono- und Di-[ $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol]-phosphat als Stabilisatoren eingesetzt wird.

#### 15 Beispiel 12

Die gesamte Menge des Magnetitniederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 15 g Mono-, 15 g Di-[Methoxy-polyethylenglykol]-phosphat (Molekulargewicht ca. 2000) und 12 g Cocarboxylase in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min mit Ultraschall dispergiert. Die entstehende Dispersion wird 30 min auf einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 T sedimentiert und der Überstand von magnetischer Flüssigkeit abgesaugt. Das Sediment auf dem Magnetfeld enthält die superparamagnetischen Teilchen. Durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser und erneuter Sedimentation im Magnetfeld können die superparamagnetischen Teilchen rein und in enger Teilchengrößenverteilung erhalten werden. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 120 nm.

Diese superparamagnetischen Teilchen sind sehr gut für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet. Hier können sie durch magnetomechanische Immunstimulierung, oder zusätzlich durch Hyperthermie, d.h. durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung und Erwärmung des Tumors, den Tumor zerstören. Magnetfelder können die Wirksamkeit der Immunstimulierung erhöhen.

Die erfindungsgemäßen neuen diphosphat- und polyphosphathaltigen Stabilisatorsubstanzen können allein, d.h. auch ohne Kopplung an die superparamagnetischen Aggregate, bei systemischer Anwendung im Körper zur Tumorschädigung eingesetzt werden. Dazu verwendet man eine Mischung aus einer oder mehreren der oben



beschriebenen Stabilisatorsubstanzen und einem pharmakologisch annehmbaren Träger, wie z.B. physiologische Kochsalzlösung.

#### Beispiel 13

4 g Mono-[ $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol]-diphosphat (Molekulargewicht ca. 1000) werden in 100 ml physiologische Kochsalzlösung gelöst und durch ein 0,2  $\mu\text{m}$ -Filter steril filtriert. Die entstehende Flüssigkeit ist für den Einsatz zur Tumorschädigung geeignet.

#### Beispiel 14

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 50 g einer 40 %-igen Natrium-silikatlösung in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min gerührt. Die entstehende Dispersion wird 30 min auf einem Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 T sedimentiert und der Überstand von magnetischer Flüssigkeit abgesaugt. Das Sediment auf dem Magnetfeld enthält die superparamagnetischen Teilchen. Durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser und erneuter Sedimentation im Magnetfeld können die superparamagnetischen Teilchen rein und in enger Teilchengrößenverteilung erhalten werden. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 120 nm.

Diese superparamagnetischen Teilchen sind sehr gut für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet. Hier können sie durch magnetomechanische Immunstimulierung oder zusätzlich durch Hyperthermie, d.h. durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung und Erwärmung des Tumors, den Tumor zerstören. Die superparamagnetischen Teilchen sind auch als orales oder i.v. Kontrastmittel für die MRI anwendbar.

#### Beispiel 15

Die gesamte Menge des  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Niederschlages von Beispiel 2 wird in eine Lösung von 20g 3-Mercaptopropyl-trimethoxysilan in 500 ml dest. Wasser gegeben und 5 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert.

Die entstehenden superparamagnetischen Teilchen haben einen Durchmesser von 310 nm. Die Dispersion wird gegen dest. Wasser dialysiert und durch ein 0,45  $\mu\text{m}$ -Filter filtriert. Das entstehende Produkt ist für die Kopplung von monoklonalen Antikörpern anwendbar.

#### Beispiel 16

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 40g  $\omega$ -Methoxy-polyethylenglykol-trimethoxysilan (Molekulargewicht 1000) in 500 ml Wasser gegeben und 10 min mit einem Ultraschalldispergator (100W Leistung), unter  
5 Erwärmen auf 70 °C, dispergiert. Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 4 beschrieben.

10 An die Polyalkylenglykolgruppen-haltigen superparamagnetischen Teilchen lassen sich auch diamagnetische Polyalkylengruppen-haltige pharmakologisch wirksame Substanzen adsorptiv binden, wobei letztere Substanzen beim magnetischen drug targeting, unter der Einwirkung eines inhomogenen Magnetfeldes, wieder von der  
15 Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen desorbiert werden. Erfolgt eine adsorptive Bindung von z.B. Doxorubicin-Monopolyethylenglykol-phosphat an Teilchen nach Beispiel 5, so kann diese Produkt für ein magnetisches drug targeting von Zytostatika in der Tumorthherapie eingesetzt werden.

20 Beispiel 17

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 45g  $\omega$ -Oxoethoxy-polyethylenglykol-silantriol (Molekulargewicht ca.1800) in 500 ml dest. Wasser  
25 gegeben und 5 min mit einem Ultraschalldispergator (100 W Leistung) dispergiert. Die entstehende Dispersion wird mit einem 50-kD-Filter gegen dest. Wasser dialysiert, um überschüssige Stabilisatorsubstanzen zu entfernen.

Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische  
30 Sedimentation wie im Beispiel 4 beschrieben. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 180 nm.

Die nach diesem Beispiel hergestellten superparamagnetischen  
35 Teilchen sind für viele Kopplungsreaktionen verwendbar, bei denen die Reaktivität der Aldehydgruppe Anwendung finden kann. So z.B. für die Kopplung von aminogruppenhaltigen pharmakologisch wirksamen Substanzen, wie Streptokinase oder Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex.

Beispiel 18

10 ml der Dispersion von Beispiel 17, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 5 mT, werden mit 30 mg Anistreplase gemischt und 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Das entstehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting zur Auflösung von Blutgerinnseln geeignet.

Beispiel 19:

10 ml der Dispersion von Beispiel 17, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 5 mT, werden mit 10ml einer 10 mg DOXORUBICIN enthaltenden Lösung gemischt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das entstehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting in der Tumorthherapie anwendbar.

Diese superparamagnetischen Teilchen sind für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet und das tumorschädigende Zytostatikum kann in erhöhter Konzentration auf den Tumor einwirken. Zusätzlich kann eine Tumorschädigung durch Hyperthermie, d.h. durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung und Erwärmung des Tumors vorgenommen werden.

Magnetfelder können die Wirksamkeit der Immunstimulierung erhöhen.

Beispiel 20

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 25 g einer Mischung aus 70 % Natriumsilikat und 30 % Natriumaluminat in 500 ml Wasser gegeben und 10 min mit einem Ultraschalldispersator (100W Leistung), unter Erwärmen auf 70 °C, dispergiert. Nach dem Neutralisieren der Dispersion mit verd. Salzsäure auf einen pH-Wert von 7, erfolgt die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 4 beschrieben. Diese superparamagnetischen Teilchen sind als orales Kontrastmittel für den gastro-intestinalen Bereich anwendbar.

Beispiel 21

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 20 g Natriumsalzes des Dextransulfates (Molekulargewicht 40.000) in 500 ml Wasser gegeben und 10 min mit einem Ultraschalldispersator (100 W Leistung), unter Erwärmen auf 70 °C, dispergiert und die Abtrennung der nicht oder nur schwach

agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 4 beschrieben. Diese superparamagnetischen Teilchen sind als orales Kontrastmittel für den gastro-intestinalen Bereich anwendbar.

Die superparamagnetischen Teilchen können auch, gekoppelt mit Tensiden, Zellmembranen zerstören und so eine Zellschädigung in vitro und in vivo hervorrufen. Als Tenside können z.B. Nonylphenol-polyethylenglykol-phosphat, Alkyl- oder Alkylaryl-polyethylenglykol-sulfate (Zahl der Ethylenoxidgruppen zwischen 5 und 40) Anwendung finden.

Um eine magnetomechanische Immunstimulierung im Körper einzuleiten, werden magnetisierbare Leukozyten parenteral in den Körper gegeben und mit Hilfe von Magnetfeldern am Wirkungsort angereichert. Durch die magnetomechanischen Kräfte werden die magnetisierten Leukozyten, und hier vor allen Dingen die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, in den Hochendothel-Venolen angereichert, beschleunigt das Endothel durchdringen und in das Gewebe eindringen. Die Anreicherung der magnetisierbaren Leukozyten, z.B. im Tumorgewebe, kann zu dessen immunologischen Schädigung führen. Vor allen Dingen dann, wenn eine magneto-mechanische Schädigung der Tumormembran durch die superparamagnetischen Teilchen eintritt und die Tumormembranbruchstücke von den benachbarten neutrophilen Granulozyten und Makrophagen phagozytiert werden. Die Ausbildung von Tumor-Antikörpern kann dann auch zur Schädigung von nicht behandelten Tumoren führen. Magnetfelder können die Wirksamkeit der Immunstimulierung erhöhen.

Zur Herstellung eines magnetisierbaren Leukozytenkonzentrates wird ein Leukozytenkonzentrat mit reaktiven superparamagnetischen Teilchen gemischt und bei Raumtemperatur oder bei 37°C zur Reaktion gebracht.

#### Beispiel 22

100 ml Leukozytenkonzentrat werden mit 10 ml der Dispersion von Beispiel 6, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 5 mT, gemischt und 20 min bei 37°C stehengelassen. Das entstehende Produkt ist für ein magnetisches drug targeting zur Tumorschädigung einsetzbar.

Eine magneto-mechanische Immunstimulierung kann z.B. auch

mit magnetisierbaren Viren, Bakterien, Pilzen, Tumorzellen oder deren magnetisierbaren Oberflächenmolekülen erfolgen. Die magnetisierbaren Viren, Zellen oder deren Oberflächenmoleküle können parenteral in den Körper gegeben werden, da sie dort vom retikuloendothelialen System erkannt und von den Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten gebunden und phagozytiert werden. Als Folge der Phagozytose werden Teile der Oberflächenmoleküle als Komplex mit ebenfalls wiederverwendeten Glycoproteinen aus dem Haupt-Histokompatibilitätskomplex an die Oberfläche der Makrophagen zurücktransportiert, wo sie von den T-Lymphozyten des Immunsystems überprüft, als Antigen erkannt und die entsprechende Immunantwort gegen die Oberflächenmoleküle aktiviert wird. Somit erfolgt eine Immunaktivierung des Körpers gegen die entsprechenden Viren und Zellen. Magnetfelder können die Wirksamkeit der Immunstimulierung erhöhen.

So kann eine Immunisierung und Behandlung von schwer therapierbaren Viren-, Bakterien- oder Pilzerkrankungen ermöglicht werden.

Die Herstellung magnetisierbarer Viren oder Zellen erfolgt durch einfaches Mischen derselben mit reaktiven superparamagnetischen Teilchen, z.B. nach Beispiel 6. Durch Zugabe eines pharmakologisch annehmbaren Trägers zur magnetisierbaren Mischung erhält man eine pharmakologisch wirksame Zubereitung zur Immunsteigerung gegen Viren und Zellen.

Die Herstellung magnetisierbarer Oberflächenmoleküle von Viren, Bakterien oder Tumorzellen erfolgt durch einfaches Mischen dieser biologischen Teilchen mit den reaktiven superparamagnetischen Teilchen und nachfolgender Blockierung der restlichen reaktiven Gruppen durch geeignete, physiologisch verträgliche Substanzen. So erfolgt z.B. das Blockieren der überschüssigen Aldehydgruppen der Stabilisatorsubstanz nach Beispiel 6, durch Zugabe einer 0,5 molaren Äthanolamin-hydrochloridlösung (pH 8,5) zur Teilchendispersion. Nach der Zerstörung der magnetisierten biologischen Teilchen mit Hilfe bekannter Aufschlußverfahren, wie Druckaufschluß, mechanisches Zermahlen, osmotische Schockbehandlung, werden die magnetisierten Oberflächenmoleküle mit Hilfe eines Magnetfeldes aus der Aufschlußdispersion entfernt. Die Reinigung der magnetisierbaren Oberflächenmoleküle erfolgt durch mehrmaliges Waschen und Abtrennen im Magnetfeld. Durch Zugabe

eines pharmakologisch annehmbaren Trägers zu den gereinigten magnetisierbaren Oberflächenmolekülen erhält man eine pharmakologisch wirksame Zubereitung zur Immunsteigerung gegen Viren und Zellen.

5 Da die Magnetisierung der Viren, Bakterien, Pilze, Tumorzellen und deren Oberflächenmoleküle in vitro erfolgt, kann auch eine patientenspezifische Immunbehandlung erfolgen. Voraussetzung dafür ist, daß eine Isolierung oder Anreicherung der entsprechenden Viren und Zellen aus dem Körper des Patienten erfolgt.

10 Die superparamagnetischen Teilchen können auch, gekoppelt mit Tensiden, Zellmembranen zerstören und so eine Zellschädigung in vitro und in vivo hervorrufen. Als Tenside können z.B. Nonylphenol-polyethylenglykol-phosphat, Alkyl- oder Alkylaryl-polyethylenglykol-sulfate (Zahl der Ethylenoxidgruppen zwischen  
15 5 und 40) Anwendung finden.

Das Hauptanwendungsgebiet der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen liegt auf dem Gebiet des magnetischen drug targeting. Aufgrund der sehr hohen Anteiles an Magnetmaterial (90 bis 98 Gew.-%) lassen sich schon kleine Magnetteilchen sehr  
20 gut und sehr schnell in bestimmte Regionen des Körpers mit Hilfe von elektromagnetischen oder Permanentmagnet-Feldern konzentrieren. Bei Kopplung von pharmakologisch wirksamen Substanzen an die superparamagnetischen Teilchen, kann deren Konzentration am Wirkungsort drastisch erhöht werden. Dieser Umstand hat für die  
25 Krebstherapie besondere Bedeutung, da die zur Chemotherapie von Tumoren eingesetzten Substanzen sehr starke Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus ausüben und bei einer Anreicherung am Wirkungsort der übrige Körper weniger stark mit Zytostatika belastet wird.

30 Die superparamagnetischen Teilchen können durch Kopplung an Viren, Zellen und deren Oberflächenmolekülen zur Immunaktivierung im Körper eingesetzt werden, wobei die Einwirkung von Magnetfeldern die Immunaktivierung unterstützt.

Die reaktiven superparamagnetischen Teilchen können auch zur  
35 in vitro Diagnostik eingesetzt werden, wenn auf der Oberfläche der Teilchen die entsprechenden diagnostischen Substanzen chemisch gebunden werden. Aufgrund der starken magnetischen Wechselwirkung mit Magnetfeldern, lassen sich auch sehr kleine superparamagnetische Teilchen nach erfolgter diagnostischer Reaktion

leicht aus dem Reaktionsgemisch wieder abtrennen.

Die superparamagnetischen Teilchen können auch als Kontrastmittel für Kernspin-Diagnostik eingesetzt werden.

Die Mengen an superparamagnetischen Teilchen liegen bei der Anwendung als Kontrastmittel für die MRI bei ca. 0,001 Vol-% des Blutvolumens, wenn die magnetische Sättigungsinduktion bei ca. 5 mT liegt.

10

15

20

25

30

35

## Patentansprüche

1. Superparamagnetische Teilchen, gekennzeichnet durch,
- 5 (a) stabile, abbaubare Aggregate mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer mit definiertem Verhalten im Magnetfeld, wobei die Aggregate
- (b) aus mehreren kleinen superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxid-, Eisenmischoxid- oder Eisen mit einer Teilchen-
- 10 größe im Bereich zwischen 3 und 20 Nanometer bestehen, die
- (c) auf ihrer Oberfläche Substanzen der Gruppe der phosphat-, diphosphat-, carboxylat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phospho-
- nat-, thiophosphonat-, sulfat-, sulfonat-, mercapto-, silantriol-, trialkoxysilangruppenhaltigen Polyalkylenglykole, der Kohlehy-
- 15 drate oder der phosphatgruppenhaltigen Nucleotide, deren Oligomere oder deren Polymere chemisch gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen haben können.
2. Superparamagnetische Teilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchengröße der superparamagnetischen Eindomänenteilchen (b) im Bereich von 3 bis 20 nm liegt und die Teilchengröße der superparamagnetischen Aggregate (a) im Bereich von 10 bis 1000 nm.
- 20 3. Superparamagnetische Teilchen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die superparamagnetischen Eindomänenteilchen (b) aus  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , aus den Eisenmischoxiden der allgemeinen Formel  $\text{MO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ , worin M die zweiwertigen Metallionen Fe, Mg, Be, Mn, Zn, Co, Ba, Sr, Cu oder Gemische davon bedeuten, aus den
- 25 Mischoxiden der allgemeinen Formel  $m\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{Me}_2\text{O}_3$ , worin Me die dreiwertigen Metallionen Al, Cr, seltene Erdmetalle oder Gemische davon bedeuten, oder Eisen bestehen.
- 30 4. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen (c) ausgewählt sind unter
- (i) den Verbindungen der allgemeinen Formel
- $\text{X} - \text{R} - \text{A} - \text{B}$
- worin X eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt aus der



Alkoxy-, Monolkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylamino- und Alkylthiogruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome im Alkylteil dieser Gruppen im Bereich von 1 und 4 liegt, oder eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethylacetal Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat- und Toluolsulfonatgruppe;

R fehlt oder

R ist ein Polyalkylenglykol, ein mit Wasser mischbarer Polypropylenglykolrest oder ein mit Wasser mischbarer Block-Copolymerisatrest aus Polyethylenglykol (PEG) und Polypropylenglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten

$(\text{PEG})_a-(\text{PEG})_b$ ,  $(\text{PEG})_a-(\text{PPG})_b-(\text{PEG})_a$ ,  $(\text{PPG})_b-(\text{PEG})_a-(\text{PPG})_b$

wobei a eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 100 und b eine positive ganze Zahl im Bereich von 1 bis 20 darstellt;

n ist eine positive ganze Zahl, ausgewählt für PEG im Bereich von 4 bis 300, für PPG im Bereich von 3 bis 12 und für PEG-PPG-Block-copolymerisat im Bereich von 3 bis 140; oder

R ist ein Kohlehydratrest, ausgewählt aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Malecitolose, Stachyose, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Dextrane, Inuline, Fruktosane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glycoproteide, aus Polyuridenylsäure, Polyglucuronsäure, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure und/oder Alginsäure bestehen; A fehlt oder

A ist eine Alkyl-, Alkoxy-, Acyl-, Acylamin-, Alkylamingruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxy-, Acyl-, Acylamin-, Alkylgruppe im Bereich von 1 bis 4 liegt;

B ist ein phosphorhaltiger Rest, ausgewählt unter Monophosphat, Diphosphat, Polyphosphat, Phosphonat, Thiophosphat, Thiophosphonat, oder ein carboxylat-, sulfat-, sulfonat-, mercapto-, silantriol-oder trialkoxysilanhaltiger Rest;

(ii) den phosphatgruppenhaltigen Nucleotiden Mono-, Di-, Triphosphorsäureester oder Mono-, Di-, Triphosphorsäureesterchloriden von Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin, Thymidin, Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin, Desoxythymidin,

Inosin, Pyrimidin, Cytosin, Uracil, Thymin, Purin, Adenin, Guanin, Methylcytosin, 5-Hydroxymethyl-cytosin, 2-Methyladenin, 1-Methylguanin, Thiamin, Flavin, Riboflavin sowie Pyridoxal-phosphat, Pyridoxaminphosphat, Ribonucleinsäure, Ribonucleinsäuresequenzen, Desoxyribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuresequenzen;

(iii) den silicatgruppenhaltigen Verbindungen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukte; und /oder

(iv) X - R - A - B ist Mercaptopurin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymin, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und deren Mercapto-desoxynucleoside;

(v) X- R -A - B ist ein Polyaminokohlehydrat.

5. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß an die superparamagnetischen Teilchen

(i) eine gewebespezifische Bindungssubstanz aus der Gruppe der Antigene, Antikörper, Ribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuren, Ribonucleinsäuresequenzen, Desoxyribonucleinsäuresequenzen, Haptene, Protein A, Protein G, Endotoxin-bindende Proteine, Lectine, Selectine;

(ii) eine pharmakologisch wirksame Substanz aus der Gruppe der Antitumorproteine, Enzyme, Antitumorenzyme, Antibiotika, Pflanzenalkaloide, Alkylierungsreagenzien, Antimetaboliten, Hormone und Hormonantagonisten, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren, Endotoxine, Lymphotoxine, Urokinase, Streptokinase, Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex, Gewebe-Plasminogen-Aktivatoren, Desmodus-Plasminogen-Aktivatoren, Makrophagen-Aktivierungskörper, Antisera, Proteaseinhibitoren und/oder radioaktiven Phosphor  $^{32}\text{P}$  enthaltene Stabilisatorsubstanzen, Tenside;

(iii) pharmakologisch wirksame Zellen aus der Gruppe der Organellen, Viren, Mikroben, Algen, Pilze, insbesondere Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und/oder Langerhans'sche Inseln;

(iv) pharmakologisch wirksamer Komplexbildner aus der Gruppe der Polycarbonsäuren, Aminocarboxylsäuren, Porphyrinen, Katecholamine;

(v) phosphat- oder phosphonatgruppenhaltige Arzneimittel; und/-

oder

(vi) zellfusionvermittelnde Substanzen chemisch gebunden sind.

5 6. Verfahren zur Herstellung superparamagnetischer Teilchen gemäß  
Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die superparamagnetischen  
Eindomänenteilchen (b) durch Fällung aus wäßrigen Eisensalzlösungen  
mit Alkalilauge oder Ammoniakwasser im pH-Bereich von 8,0 bis  
10,0 hergestellt, mit einer Säure auf einen pH-Wert zwischen 3  
10 und 7 eingestellt und bei einer Temperatur im Bereich von 50 bis  
120 °C und gegebenenfalls erhöhtem Druck in diesem pH- und Temperaturbereich zur Aggregation gebracht, in an sich bekannter Weise  
gereinigt und mit 20 bis 50 Gew.-% organischer Substanz (c)  
versetzt und in an sich bekannter Weise gereinigt und gegebenenfalls  
15 noch mit pharmakologisch oder diagnostisch wirksamen Substanzen  
in an sich bekannter Weise gekoppelt werden.

7. Pharmakologisch wirksame Zubereitung, bestehend aus einem  
pharmakologisch annehmbaren Träger und superparamagnetischen  
Teilchen nach Anspruch 1 mit einer Teilchengröße im Bereich  
20 zwischen 10 und 1000 nm, gegebenenfalls in Verbindung mit einer  
gewebespezifischen Bindungssubstanz, einer pharmakologisch  
wirksamen Substanz, einer pharmakologisch wirksamen Zelle, einem  
pharmakologisch wirksamen Komplexbildner, einem Arzneimittel oder  
einer zellfusionsvermittelnden Substanz der in Anspruch 5 genannten  
25 Gruppen.

8. Verwendung einer pharmakologisch wirksamen Zubereitung nach  
Anspruch 7 zur Tumorschädigung und Immunsteigerung, wahlweise  
unter Einwirkung von Magnetfeldern.

30

35

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> : <b>A61K 9/50, 49/00</b>		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 94/21240</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>29. September 1994 (29.09.94)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE94/00314</b>		(81) Bestimmungsstaaten: JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>17. März 1994 (17.03.94)</b>			
(30) Prioritätsdaten: P 43 09 333.7      17. März 1993 (17.03.93)      DE P 44 07 338.0      2. März 1994 (02.03.94)      DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>SILICA GEL GES.M.B.H [DE/DE]; Ahornallee 36, D-14050 Berlin (DE).</b>		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: <b>13. Oktober 1994 (13.10.94)</b>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>PILGRIMM, Herbert [DE/DE]; Sophie-Charlotte-Strasse 27a, D-14169 Berlin (DE).</b>			
(74) Anwälte: <b>WALTER, Wolf-Jürgen usw.; Normannenstrasse 1-2, D-10367 Berlin (DE).</b>			
(54) Title: <b>SUPERPARAMAGNETIC PARTICLES, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND THEIR USE</b>			
(54) Bezeichnung: <b>SUPERPARAMAGNETISCHE TEILCHEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG DERSELBEN</b>			
(57) Abstract			
<p>New superparamagnetic particles useful in medicine for destroying tumors, increasing immunity and diagnosing conditions are disclosed. For that purpose, very small superparamagnetic single-domain particles are aggregated and protected against further aggregation by chemical bonding of reactive stabilizer substances on the surface of the superparamagnetic particles. These new particles thus consist of stable, decomposable aggregates with a particle size in a range between 10 and 1000 nanometres and a defined behaviour in a magnetic field. The aggregates consist of several small superparamagnetic single-domain particles of iron oxide, iron mixed oxide or iron, with a particle size in a range between 3 and 20 nanometres, bearing on their surface chemically bound organic substances from the group comprising the phosphate, diphosphate, polyphosphate, thiophosphate, phosphonate or group containing polyalkylene glycols, phosphate group containing nucleotides, their oligomers or polymers, as well as phosphate group containing carbohydrates, which may present further binding sites. Both the new disclosed superparamagnetic aggregates and reactive stabilizer substances may be active substances.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft neue superparamagnetische Teilchen, die in der Medizin zur Tumorschädigung, Immunsteigerung und Diagnostik eingesetzt werden können. Erfindungsgemäß erreicht man dies, indem sehr kleine superparamagnetische Eindomänenteilchen zur Aggregation gebracht werden und durch eine chemische Bindung von reaktiven Stabilisatorsubstanzen auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen vor einer weiteren Aggregation geschützt werden. Die neuen Teilchen bestehen daher aus stabilen, abbaubaren Aggregaten mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer mit definiertem Verhalten im Magnetfeld, wobei die Aggregate aus mehreren kleinen superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxid, Eisenmischoxid oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 20 Nanometer bestehen, die auf ihrer Oberfläche organische Substanzen der Gruppe der phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat- oder thiophosphonatgruppenhaltige Polyalkylenglykole, phosphatgruppenhaltige Nucleotide, deren Oligomere oder deren Polymere sowie phosphatgruppenhaltige Kohlehydrate chemisch gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen haben können. Es können sowohl die neuen superparamagnetischen Aggregate als auch die reaktiven Stabilisatorsubstanzen im erfindungsgemäßen Sinne wirksame Substanzen sein.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TC	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 94/00314

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 5 A61K9/50 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,90 01899 (ADVANCED MAGNETICS) 8 March 1990 see abstract see page 6, line 1 - line 34 see page 10, line 29 - page 11, line 23 see page 12, line 27 - page 13, line 24 see page 17, line 10 - line 27 see page 20, line 17 - page 21, line 3; claims ---	1-4,6
X	WO,A,90 01295 (ADVANCED MAGNETICS) 22 February 1990 see abstract see page 11, line 23 - line 34 see page 20, line 6 - page 21, line 35 see page 31, line 17 - page 33, line 22; claims --- -/-	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*Z\* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search  12 August 1994	Date of mailing of the international search report  23. 08. 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer  Hoff, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 94/00314

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,88 00060 (ADVANCED MAGNETICS) 14 January 1988 see abstract; claims ---	1-7
X	US,A,5 069 216 (GROMAN ET AL.) 3 December 1991 see column 6, line 10 - line 54 see column 7, line 57 - column 8, line 21 see column 9, line 40 - line 50 see column 17, line 37 - column 18, line 10; claims ---	1-7
A	EP,A,0 284 549 (SILICA GEL) 28 September 1988 cited in the application see the whole document ---	1-8
A	EP,A,0 125 995 (ADVANCED MAGNETICS) 21 November 1984 cited in the application & US,A,4 554 088 (CHAGNON ET AL.) 19 November 1985 see abstract; claims ---	1-8
A	MAGMA, vol.1, no.2, 1993 pages 83 - 88 A ROCH ET AL. 'IN VITRO RELAXOMETRIC CHARACTERIZATION OF SUPERPARAMAGNETIC CONTRAST AGENTS' see the whole document ---	1-8
A	EP,A,0 516 252 (INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG) 2 December 1992 see abstract; claims -----	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 94/00314

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Remark: Although the claim 8 refer to a process for treatment of the human/animal body, the search was carried out and based on the indicated effects of the compound/composition.**
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐  
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 94/00314

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9001899	08-03-90	US-A- 5055288 EP-A- 0441797 US-A- 5314679	08-10-91 21-08-91 24-05-94
WO-A-9001295	22-02-90	EP-A- 0381742 JP-T- 4501218 US-A- 5141739 US-A- 5262176 US-A- 5284646	16-08-90 05-03-92 25-08-92 16-11-93 08-02-94
WO-A-8800060	14-01-88	US-A- 4827945 US-A- 4770183 CA-A- 1301063 EP-A- 0275285 JP-T- 1500196 US-A- 5055288 US-A- 5141739 US-A- 5262176 US-A- 5284646 US-A- 5248492 US-A- 5219554 US-A- 5314679 US-A- 4951675 US-A- 5069216 US-A- 5102652	09-05-89 13-09-88 19-05-92 27-07-88 26-01-89 08-10-91 25-08-92 16-11-93 08-02-94 28-09-93 15-06-93 24-05-94 28-08-90 03-12-91 07-04-92
US-A-5069216	03-12-91	US-A- 4951675 US-A- 4770183 US-A- 5248492 US-A- 5219554 CA-A- 1301063 EP-A- 0275285 JP-T- 1500196 US-A- 4827945 WO-A- 8800060 US-A- 5102652 US-A- 5141739 US-A- 5262176 US-A- 5284646 US-A- 5314679	28-08-90 13-09-88 28-09-93 15-06-93 19-05-92 27-07-88 26-01-89 09-05-89 14-01-88 07-04-92 25-08-92 16-11-93 08-02-94 24-05-94

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/DE 94/00314

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0284549	28-09-88	DE-A- 3709851 DE-T- 3872741 ES-T- 2052766 JP-A- 63255237 US-A- 5160725	06-10-88 20-08-92 16-07-94 21-10-88 03-11-92
EP-A-0125995	21-11-84	US-A- 4554088 CA-A, C 1254028 DE-A- 3485332 EP-A- 0357593 JP-A- 60001564 WO-A- 8806632 US-A- 4628037 US-A- 4695392 US-A- 4695393 US-A- 4698302 US-A- 4672040	19-11-85 16-05-89 23-01-92 14-03-90 07-01-85 07-09-88 09-12-86 22-09-87 22-09-87 06-10-87 09-06-87
US-A-4554088	19-11-85	CA-A, C 1254028 DE-A- 3485332 EP-A, B 0125995 EP-A- 0357593 JP-A- 60001564 WO-A- 8806632 US-A- 4628037 US-A- 4695392 US-A- 4695393 US-A- 4698302 US-A- 4672040	16-05-89 23-01-92 21-11-84 14-03-90 07-01-85 07-09-88 09-12-86 22-09-87 22-09-87 06-10-87 09-06-87
EP-A-0516252	02-12-92	DE-A- 4117782 AU-A- 1618492	03-12-92 03-12-92

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 94/00314

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 5 A61K9/50 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 5 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,90 01899 (ADVANCED MAGNETICS) 8. März 1990 siehe Zusammenfassung siehe Seite 6, Zeile 1 - Zeile 34 siehe Seite 10, Zeile 29 - Seite 11, Zeile 23 siehe Seite 12, Zeile 27 - Seite 13, Zeile 24 siehe Seite 17, Zeile 10 - Zeile 27 siehe Seite 20, Zeile 17 - Seite 21, Zeile 3; Ansprüche --- -/--	1-4,6

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. August 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23. 08. 94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoff, P

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00314

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,90 01295 (ADVANCED MAGNETICS) 22. Februar 1990 siehe Zusammenfassung siehe Seite 11, Zeile 23 - Zeile 34 siehe Seite 20, Zeile 6 - Seite 21, Zeile 35 siehe Seite 31, Zeile 17 - Seite 33, Zeile 22; Ansprüche ---	1-7
X	WO,A,88 00060 (ADVANCED MAGNETICS) 14. Januar 1988 siehe Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-7
X	US,A,5 069 216 (GROMAN ET AL.) 3. Dezember 1991 siehe Spalte 6, Zeile 10 - Zeile 54 siehe Spalte 7, Zeile 57 - Spalte 8, Zeile 21 siehe Spalte 9, Zeile 40 - Zeile 50 siehe Spalte 17, Zeile 37 - Spalte 18, Zeile 10; Ansprüche ---	1-7
A	EP,A,0 284 549 (SILICA GEL) 28. September 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-8
A	EP,A,0 125 995 (ADVANCED MAGNETICS) 21. November 1984 in der Anmeldung erwähnt & US,A,4 554 088 (CHAGNON ET AL.) 19. November 1985 siehe Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-8
A	MAGMA, Bd.1, Nr.2, 1993 Seiten 83 - 88 A ROCH ET AL. 'IN VITRO RELAXOMETRIC CHARACTERIZATION OF SUPERPARAMAGNETIC CONTRAST AGENTS' siehe das ganze Dokument ---	1-8
A	EP,A,0 516 252 (INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG) 2. Dezember 1992 siehe Zusammenfassung; Ansprüche -----	1-8

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Bemerkung: Obwohl der Anspruch 8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung und Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00314

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO-A-9001899	08-03-90	US-A-	5055288	08-10-91
		EP-A-	0441797	21-08-91
		US-A-	5314679	24-05-94
-----				
WO-A-9001295	22-02-90	EP-A-	0381742	16-08-90
		JP-T-	4501218	05-03-92
		US-A-	5141739	25-08-92
		US-A-	5262176	16-11-93
		US-A-	5284646	08-02-94
-----				
WO-A-8800060	14-01-88	US-A-	4827945	09-05-89
		US-A-	4770183	13-09-88
		CA-A-	1301063	19-05-92
		EP-A-	0275285	27-07-88
		JP-T-	1500196	26-01-89
		US-A-	5055288	08-10-91
		US-A-	5141739	25-08-92
		US-A-	5262176	16-11-93
		US-A-	5284646	08-02-94
		US-A-	5248492	28-09-93
		US-A-	5219554	15-06-93
		US-A-	5314679	24-05-94
		US-A-	4951675	28-08-90
		US-A-	5069216	03-12-91
		US-A-	5102652	07-04-92
-----				
US-A-5069216	03-12-91	US-A-	4951675	28-08-90
		US-A-	4770183	13-09-88
		US-A-	5248492	28-09-93
		US-A-	5219554	15-06-93
		CA-A-	1301063	19-05-92
		EP-A-	0275285	27-07-88
		JP-T-	1500196	26-01-89
		US-A-	4827945	09-05-89
		WO-A-	8800060	14-01-88
		US-A-	5102652	07-04-92
		US-A-	5141739	25-08-92
		US-A-	5262176	16-11-93
		US-A-	5284646	08-02-94
		US-A-	5314679	24-05-94

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internation. Aktenzeichen

PCT/DE 94/00314

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0284549	28-09-88	DE-A- 3709851	06-10-88
		DE-T- 3872741	20-08-92
		ES-T- 2052766	16-07-94
		JP-A- 63255237	21-10-88
		US-A- 5160725	03-11-92
EP-A-0125995	21-11-84	US-A- 4554088	19-11-85
		CA-A, C 1254028	16-05-89
		DE-A- 3485332	23-01-92
		EP-A- 0357593	14-03-90
		JP-A- 60001564	07-01-85
		WO-A- 8806632	07-09-88
		US-A- 4628037	09-12-86
		US-A- 4695392	22-09-87
		US-A- 4695393	22-09-87
		US-A- 4698302	06-10-87
		US-A- 4672040	09-06-87
US-A-4554088	19-11-85	CA-A, C 1254028	16-05-89
		DE-A- 3485332	23-01-92
		EP-A, B 0125995	21-11-84
		EP-A- 0357593	14-03-90
		JP-A- 60001564	07-01-85
		WO-A- 8806632	07-09-88
		US-A- 4628037	09-12-86
		US-A- 4695392	22-09-87
		US-A- 4695393	22-09-87
		US-A- 4698302	06-10-87
		US-A- 4672040	09-06-87
EP-A-0516252	02-12-92	DE-A- 4117782	03-12-92
		AU-A- 1618492	03-12-92